

Mechanizm działania cytochromu bc_1 w kontekście pełnienia funkcji katalitycznych i produkcji wolnych rodników

Oskar Lipiński

Zakład Biofizyki Molekularnej

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

oskar.j.lipinski@gmail.com

Praca napisana pod opieką prof. dr. hab. Artura Osyczki

Przekształcanie energii w układach biologicznych do form fizjologicznie użytecznych jest procesem niezwykle złożonym. Jednym z białek związanych z oddychaniem komórkowym jest cytochrom bc_1 znany też jako kompleks III. Białko to składa się z dwóch jednakowych monomerów tworzących funkcjonalny homodimer. W skład monomeru wchodzi trzy podjednostki katalityczne: cytochrom b , cytochrom c_1 oraz ruchoma podjednostka FeS. W cyklu katalitycznym biorą udział kofaktory redoks rozlokowane w poszczególnych podjednostkach. W wyniku utleniania ubichinolu w miejscu Q_o dochodzi do uwolnienia dwóch elektronów. Pierwszy z nich wędruje na łańcuch wysokopotencjałowy, a następnie redukuje cytochrom c , a drugi poprzez niskopotencjałowy łańcuch hemów typu b , redukuje związany w miejscu Q_i ubichinon. Do pełnej redukcji ubichinonu w miejscu Q_i potrzebne są dwa akty związania ubichinolu w miejscu Q_o , co prowadzi do częściowego odtworzenia puli zredukowanej formy tego związku w środowisku błonowym. Sekwencyjne przyłączanie oraz odłączanie elektronów z cząsteczki ubichinonu/ubichinolu powoduje powstawanie form semichinonowych, które poprzez oddziaływanie z tlenem mogą generować wolne rodniki. Eksperymenty ostatnich lat znacznie poszerzyły naszą wiedzę na temat form semichinonowych w cytochromie bc_1 i sposobu ich oddziaływania ze znajdującymi się w pobliżu kofaktorem redoks. Udowodniono także, że możliwy jest transfer elektronów pomiędzy dwoma monomerami w obrębie jednego kompleksu.

Wprowadzenie

Konwersja energii jest jednym z najbardziej fundamentalnych procesów niezbędnych dla funkcjonowania organizmów. Wiąże się ona z generowaniem siły protonomotorycznej (PMF),

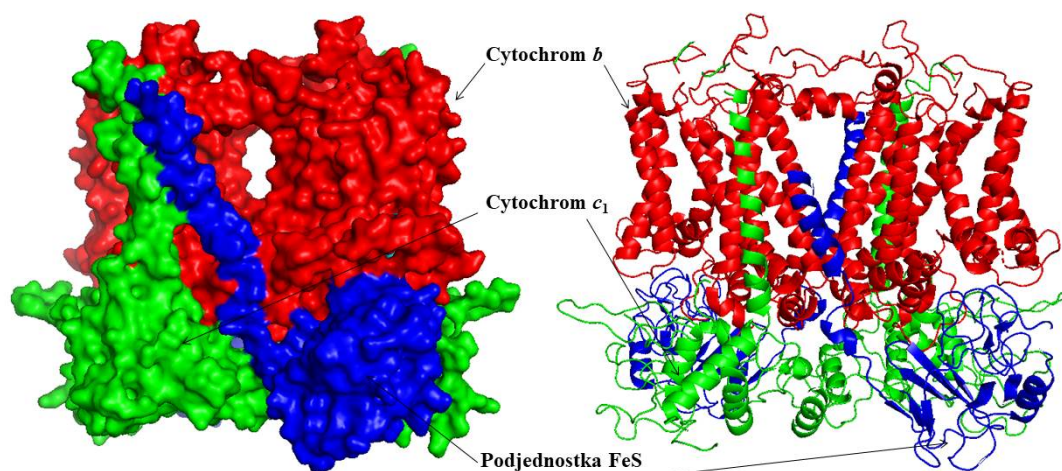
która jest niezbędna do wytwarzania ATP z ADP i P_i . Generowanie PMF oparte jest przede wszystkim na transferze elektronów i sprzężonej z nim translokacji protonów w poprzek błony. W układach biologicznych,

w procesy te zaangażowane są wysoko wyspecjalizowane białka oraz niskocząsteczkowe związki organiczne. Tworzą one łańcuchy transportu elektronów, których głównym zadaniem jest przekształcenie jednego rodzaju energii w inny. Najbardziej znanymi układami przekształcającymi energię są mitochondrialny łańcuch oddechowy oraz chloroplastowy łańcuch fotosyntetyczny [1]. Jednym z powszechnie występujących enzymów jest oksydoreduktaza ubichinol-cytochrom c , opisywana jako cytochrom bc_1 w układach bakteryjnych lub kompleks III w kontekście oddychania mitochondrialnego. Enzym ten wykorzystuje reakcje utleniania/redukcji ubichinolu/ubichinonu do translokacji protonów oraz jako jedyny łączy ze sobą dwie odseparowane pule ruchomych przekaźników elektronów –

pulę ubichinonu w błonie oraz pulę cytochromu c w przestrzeni międzybłonowej [2, 3].

Struktura cytochromu bc_1

Cytochrom bc_1 funkcjonuje jako homodimer [4]. Każdy z monomerów posiada rdzeń katalityczny składający się z trzech podjednostek: cytochromu b , cytochromu c_1 oraz podjednostki FeS (białka Rieskego) – Ryc. 1. Każda z tych podjednostek zawiera kofaktory redoks, które zdolne są do przyjęcia lub oddania elektronu [3]. Cytochrom b to największa z podjednostek tego kompleksu. Jest to transbłonowe białko zbudowane z ośmiu helis ułożonych prostopadle do powierzchni błony. Posiada ono dwa miejsca katalityczne: Q_o oraz Q_i , które odpowiedzialne są za wiązanie cząsteczek



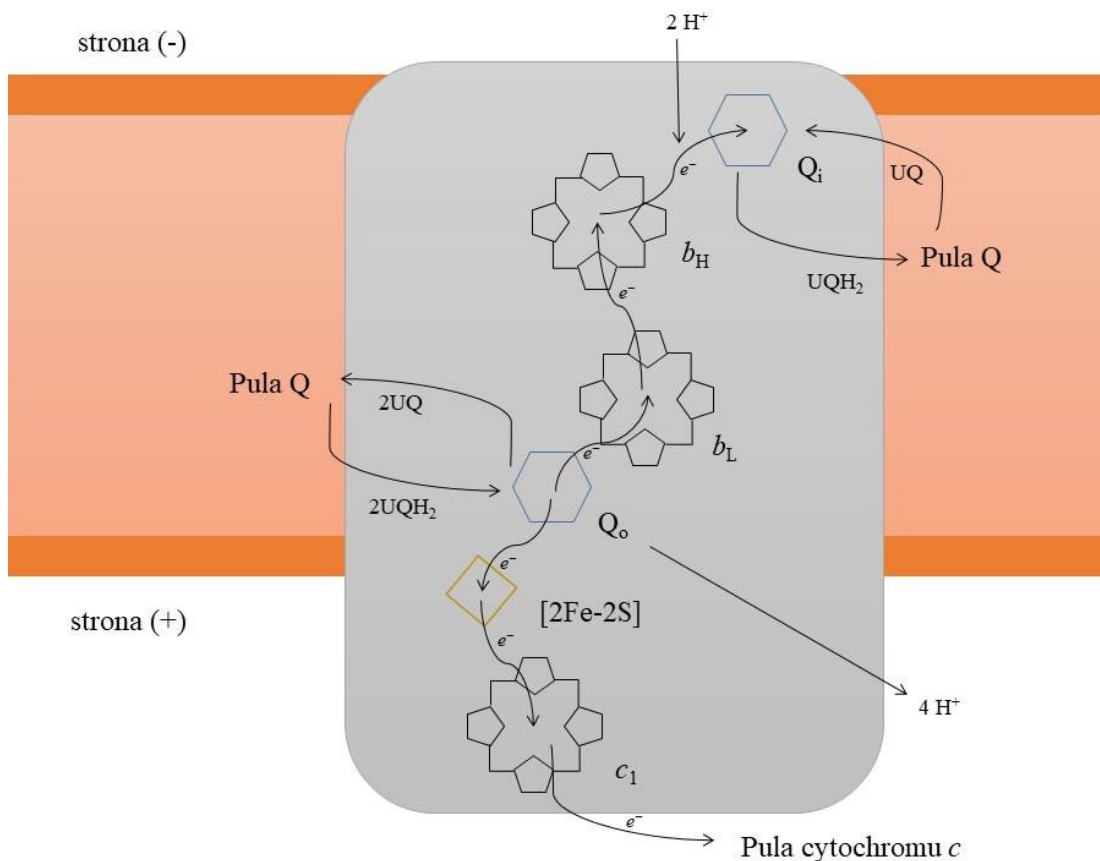
Ryc. 1. Struktura krystalograficzna cytochromu bc_1 z *Rhodobacter capsulatus* (baza danych RCSB - 1ZRT) [5]. Kolory czerwony, niebieski i zielony odpowiadają kolejno cytochromowi b , podjednostce FeS oraz cytochromowi c_1 .

ubichinonu/ubichinolu. Miejsca te połączone są łańcuchem hemów typu b (kolejno b_L o niskim potencjale redoks ($E_{m7} \sim -0,2$ do $0,05$ V) i b_H o wysokim potencjale redoks ($E_{m7} \sim +0,05$ do $+0,15$ V) – w zależności od organizmu), zwanym łańcuchem niskopotencjałowym [6]. Warto tutaj wspomnieć, że hemy typu b wiążą się z białkiem tylko za pomocą wiązań koordynacyjnych, a nie koordynacyjnych i kowalencyjnych jak hemy typu c. Kolejna z podjednostek – cytochrom c_1 składa się z hydrofilowej domeny zawierającej kowalencyjnie związany hem typu c oraz jednej transbłonowej α -helisy. Hem c_1 charakteryzuje się wysokim potencjałem redoks ($E_{m7} \sim +0,25$ do $+0,35$ V). Podobnie, klaster żelazowo-siarkowy ([2Fe-2S]) podjednostki FeS posiada wysoki potencjał redoks ($E_{m7} \sim +0,25$ do $+0,35$ V). Z tego powodu, w celu odróżnienia go od łańcucha hemów typu b, nazywa się go łańcuchem wysokopotencjałowym. Podjednostka FeS składa się z domeny hydrofilowej, w której położony jest klaster żelazowo-siarkowy, oraz transbłonowej α -helisy, która zakotwicza podjednostkę w błonie. Jej położenie sprawia, że w przeciwieństwie do pozostałych podjednostek, nie przynależy ona strukturalnie wyłącznie do jednego monomeru [7]. Co więcej, struktury krystalograficzne pokazały, że białko Rieskego może znajdować się w różnym położeniu względem pozostałych podjednostek (w pobliżu cytochromu c_1 oraz w oddaleniu od rdzenia białkowego). Obserwacja ta, poparta szeregiem badań biochemicznych i kinetycznych, pozwala stwierdzać,

że podjednostka ta wykonuje ruch rotacyjno-translacyjny w trakcie cyklu katalitycznego, co umożliwia sprawne przenoszenie elektronów z cytochromu bc_1 na związane z przestrzenią międzybłonową białko – cytochrom c. W skład monomeru w najprostszych kompleksach bakteryjnych, np. u *Rhodobacter capsulatus*, wchodzi jedynie trzy opisane wyżej podjednostki. W innych kompleksach, np. u *Rhodobacter sphaeroides*, występuje dodatkowa podjednostka, a w ludzkim i wołowym kompleksie jest ich osiem [8]. Ich rola nie jest do końca jasna, ale wiadomo, że nie zawierają one ko-faktorów redoks. Sugeruje się, że mogą być one zaangażowane w pozycjonowanie podjednostki FeS względem reszty kompleksu poprzez swoją aktywność proteolityczną [9].

Czynniki określające wydajność transferu elektronów

Biologiczny transfer elektronów związany jest z efektem tunelowym, polegającym na przejściu elektronów przez barierę potencjału o wysokości większej niż ich energia. To zjawisko opisywane jest przez mechanikę kwantową. Na szybkość transferu składają się dwa zasadnicze czynniki. Pierwszym z nich jest odległość między centrami, pomiędzy którymi zachodzi tunelowanie. Im bliżej znajdują się centra, tym szybszy jest ten proces. Związane jest to z nakładaniem się funkcji falowych donora i akceptora elektronu, którego siła zmniejsza się wraz ze wzrostem odległości. Aby taki transfer był efektywny nie powinna ona przekraczać 14



Ryc. 2. Schematyczne przedstawienie cyklu katalitycznego cytochromu bc_1 . W miejscu Q_o następuje rozdział transferu elektronów na dwa łańcuchy kofaktorów. W miejscu Q_i związany ubiquinon w wyniku dwóch obrotów katalitycznych przyjmuje dwa elektrony oraz dwa protony i przekształca się w ubiquinol. Efektem sprzężenia tych dwóch miejsc w pętlę redoks jest translokacja protonów w poprzek błony.

Å. Drugim czynnikiem wpływającym na szybkość transferu jest tzw. siła napędowa, proporcjonalna do różnicy potencjałów redoks obydwu centrów. Można ją interpretować jako energię uwolnioną podczas spontanicznego transferu elektronu od niskopotencjałowego kofaktora do wysokopotencjałowego. Takie reakcje są korzystne pod względem energetycznym [10,11].

Cykl katalityczny

Cytochrom bc_1 działa w oparciu o tzw. cykl Q, którego mechanizm został zaproponowany przez Petera Mitchella w 1975 roku [12] i nieco zmodyfikowany w późniejszych latach [13]. Polega on na sprzężeniu działania centrów Q_o oraz Q_i w pętlę redoksową. Utlenienie ubiquinolu (UQH_2) w miejscu Q_o ,

znajdującym się blisko dodatnio naładowanej strony błony, wiąże się z uwolnieniem dwóch elektronów oraz dwóch protonów. Związany w miejscu Q_i , w pobliżu przestrzeni międzylonowej, ubichinon (UQ) jest zdolny do redukcji i odtworzenia puli UQH_2 – Ryc. 2. UQH_2 pełni w ten sposób jednocześnie rolę substratu oraz produktu. Miejsce Q_o łączy ze sobą wcześniej wspomniane dwa funkcjonalne łańcuchy kofaktorów. Przyjrzyjmy się więc bliżej temu, jak są one wykorzystywane.

W trakcie utleniania cząsteczka ubichinolu oddaje dwa elektrony. Jeden z tych elektronów wędruje na klaster żelazowo-siarkowy podjednostki FeS, która w wyniku reorientacji względem reszty kompleksu przekazuje go na hem c_1 . Praca mechaniczna wykonana przez podjednostkę FeS pozwala na zmianę polarności środowiska, w którym zachodzi dalszy transfer elektronów. Cytochrom *c*, będący małym hydrofilowym białkiem, pełni funkcję odbiorcy elektronu od kompleksu III. Drugi elektron wędruje na niskopotencjałowy łańcuch hemów *b*. Związany w miejscu Q_i ubichinon przyjmuje ten elektron i jednocześnie redukuje się do wolnorodnikowej formy – ubisemichinonu (USQ). Do pełnego cyklu katalitycznego, a więc do oddysocjowania cząsteczki ubichinolu z miejsca Q_i , potrzebne są zatem dwa akty związania ubichinonu w miejscu Q_o . Sumarycznie, w trakcie pełnego cyklu katalitycznego, utleniane są dwie cząsteczki UQH_2 , redukowana jedna cząsteczka UQ i dwie cząsteczki cytochromu *c*. Następuje

także oddanie czterech protonów i przyjęcie dwóch protonów po przeciwnej stronie błony.

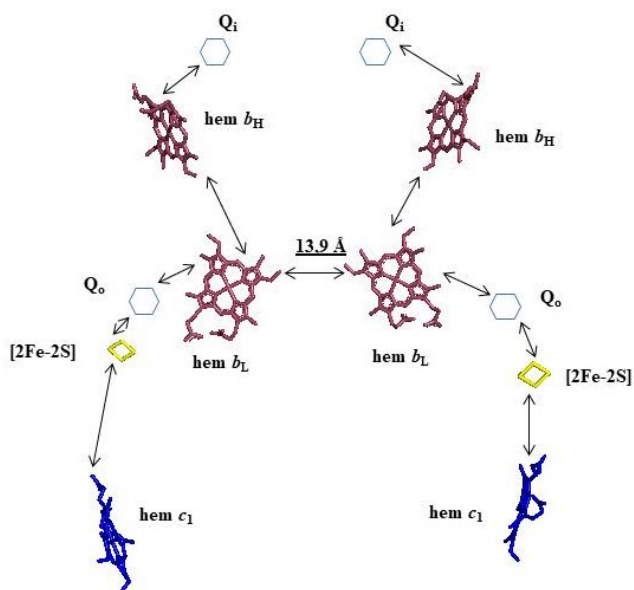
Rozdzielenie szlaku elektronów, zachodzące w centrum Q_o , znane jest jako reakcja bifurkacji. Jest to reakcja wyjątkowa spośród wszystkich znanych reakcji w układach biologicznych. Jednak jeśli przyrzeć się jej bliżej, można zastanowić się nad tym, który łańcuch – nisko czy wysokopotencjałowy wybierze pierwszy elektron? A może obydwie elektrony jednocześnie odrywają się od cząsteczki UQH_2 ? Proponowane są dwa odmienne modele opisujące jej mechanizm. Pierwszym z nich jest model sekwencyjny, który zakłada, że zachodzą dwa następujące po sobie transfery elektronów. Pierwszy z elektronów redukuje klaster żelazowo siarkowy, w wyniku czego powstaje cząsteczka ubisemichinonu posiadająca niesparowany elektron. Cząsteczka ta jest mało stabilna i oddaje elektron na hem b_L . Drugim modelem jest model jednoczesny, w którym oba elektrony przekazywane są jednocześnie bez powstawania wolnorodnikowego stanu pośredniego [14,15,16]. Niedawne badania wykazały, że w szczególnych okolicznościach możliwe jest zaobserwowanie formy semichinonowej, której obecność wrażliwa jest na specyficzne względem miejsca Q_o inhibitory [17]. Wydaje się, że model sekwencyjny lepiej opisuje realny mechanizm bifurkacji.

Transfer elektronów w obrębie dimeru

Rozpatrywane powyżej mechanizmy

obejmowały reakcje zachodzące na poziomie jednego monomeru. Możliwość transferu elektronów pomiędzy monomerami była jednak rozpatrywana już od momentu publikacji pierwszych struktur krystalograficznych [18]. Wynika z nich, że odległość pomiędzy dwoma hemami b_L wynosi ok. 14 Å – Ryc. 3. Dystans ten jest wystarczający na możliwy pod względem skali czasowej transfer elektronów. Obliczony czas transferu elektronu pomiędzy dwoma hemami b_L wynosi 0,025 – 0,25 ms, podczas gdy na zajście jednego obrotu w trakcie katalizy potrzeba 0,5 – 5 ms [14]. Wydaje się więc, że hemy b_L tworzą mostek

rozpięty pomiędzy dwoma monomerami. W ostatnich latach udowodniono, że taki transfer rzeczywiście jest możliwy. Eksperymenty, które doprowadziły do tego odkrycia polegały na asymetrycznym wyłączeniu centrów Q_i oraz Q_o , tak, aby jedyna droga transferu elektronów łącząca te dwa centra prowadziła przez mostek hemowy [4,19]. Modyfikacja tego typu była trudna do zrealizowania, gdyż poszczególne monomery są nierozróżnialne na poziomie genetycznym. Aby osiągnąć modyfikację asymetryczną w dimerze, zastosowano system oparty na skonstruowaniu białka fuzyjnego za-



Ryc. 3. H-kształtne rozmieszczenie kofaktorów w dimerze cytochromu bc_1 z zaznaczonym połączeniem hemów b_L obydwu monomerów. Sześciokątami zaznaczono przybliżone miejsca wiązania ubichinonu/ubichinolu. Odległość pomiędzy dwoma hemami b_L została podkreślona.

stępującego pojedyncze monomery. W oparciu o badania zaproponowano model działania cytochromu bc_1 , który swoją budową przypomina literę H. Pozostaje jednak pytanie, jakie znaczenie fizjologiczne ma H-kształtne połączenie między centrami katalitycznymi. Można zakładać, że system ten jest elementem obrony przed efektami mutacji mitochondrialnych. Jest to związane z właściwością tego systemu, która polega na tym, że funkcjonalność cytochromu bc_1 zostaje zachowana tak długo, jak istnieje jakiekolwiek połączenie między aktywnymi centrami Q_i i Q_o .

Stany semichinonowe i generacja reaktywnych form tlenu

Formowanie się ubisemichinonu w centrum Q_i jest zjawiskiem obserwowanym od wielu lat. Sygnał pochodzący od tego stanu pośredniego wrażliwy jest na antymycynę, czyli inhibitor specyficzny względem centrum Q_i . Rodnik ten charakteryzuje się wysoką stabilnością i nie reaguje z tlenem, co zabezpiecza enzym przed produkcją reaktywnych form tlenu (RFT). Z najnowszych badań wynika, że istnieją dwie formy tego związku – forma wolno- oraz szybko-relaksująca. Pierwszą z nich wiąże się ze zredukowanym hemem b_H , a drugą z utlenionym hemem b_H [20]. Forma szybko-relaksująca oddziałuje jonowo ze wcześniej wspomnianym hemem, odzwierciedlając stan pośredni powstający w trakcie cyklu katalitycznego enzymu.

Przez wiele lat nie udało się natomiast wykryć semichinonu wrażliwego na obecność specyficznych inhibitorów centrum Q_o . Wiązano to przede wszystkim z jego wysoką niestabilnością i bardzo krótkim czasem życia. Inne hipotezy zakładały, że w miejscu Q_o może powstawać stabilny semichinon, ale na skutek silnych oddziaływań antyferromagnetycznych z pobliskim klastrem żelazowo-siarkowym jest on niewidoczny w eksperymentach wykorzystujących spektroskopię elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) do jego detekcji [21]. Ostatnie badania wykazały jednak jednoznacznie, że dochodzi do formowania się tego stanu pośredniego. Semichinon wygenerowany w miejscu Q_o oddziałuje magnetycznie z klastrem [2Fe-2S] białka Rieskego. Jest to jednak stosunkowo słabe oddziaływanie wymienne, prowadzące do pojawienia się na widmie EPR nowego przejścia rezonansowego, którego amplituda jest niezależna od obecności tlenu. Obecność tego sygnału wykazano także w cytochromie b_6f [22]. Przejściu temu towarzyszy sygnał o charakterze wolnorodnikowym, który jest identyfikowany jako ubisemichinon niezwiązany oddziaływaniem wymiennym z [2Fe-2S] [17]. Na podstawie tej obserwacji zaproponowano nowy mechanizm bifurkacji, który zakłada że para USQ_o -FeS jest początkowym etapem tej reakcji, kiedy białko żelazowo-siarkowe odebrało już elektron, ale nie odsunęło się jeszcze od centrum Q_o . Stan ten nie reaguje z tlenem cząsteczkowym, co chroni enzym przed nadmierną produkcją reaktyw-

nych form tlenu.

Warto się jeszcze zastanowić, czy istnieją inne mechanizmy zabezpieczające enzym przed produkcją RFT oprócz wcześniej wspomnianego oddziaływania ubisemichinonu z klastrem żelazowo-siarkowym. Odpowiedzią może być H-kształtny transfer elektronów pomiędzy monomerami. Połączenie czterech hemów b może być traktowane jako element chroniący przed produkcją wolnych rodników w miejscu Q_o , gdyż zredukowany hem b_L , będący nieodłączną częścią tego zjawiska może oddać elektron zarówno hemowi b_H , jak również hemowi b_L znajdującemu się na sąsiednim monomerze [23].

Bibliografia

1. Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature*. 1961;191:144-8.
2. Pintscher, S. et al., Molekularny mechanizm reakcji katalitycznych i produkcji wolnych rodników przez cytochrom bc1. *Postępy Biochemii*. 2014;60(3):285-294.
3. Sarewicz M, Osyczka A. Electronic connection between the quinone and cytochrome C redox pools and its role in regulation of mitochondrial electron transport and redox signaling. *Physiol Rev*. 2015;95(1):219-43.
4. Swierczek M, Cieluch E, Sarewicz M, et al. An electronic bus bar lies in the core of cytochrome bc1. *Science*. 2010;329(5990):451-4.
5. Berry EA, Huang LS, Saechao LK, Pon NG, Valkova-valchanova M, Daldal F. X-Ray Structure of Rhodobacter Capsulatus Cytochrome bc (1): Comparison with its Mitochondrial and Chloroplast Counterparts. *Photosyn Res*. 2004;81(3):251-75.
6. Zhang H, Chobot SE, Osyczka A, Wraight CA, Dutton PL, Moser CC. Quinone and non-quinone redox couples in Complex III. *J Bioenerg Biomembr*. 2008;40(5):493-9.
7. Darrouzet E, Valkova-valchanova M, Moser CC, Dutton PL, Daldal F. Uncovering the [2Fe2S] domain movement in cytochrome bc1 and its implications for energy conversion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(9):4567-72.
8. Xia D, Esser L, Tang WK, et al. Structural analysis of cytochrome bc1 complexes: implications to the mechanism of function. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1827(11-12):1278-94.
9. Braun HP, Emmermann M, Kruft V, Schmitz UK. The general mitochondrial processing peptidase from potato is an integral part of cytochrome c reductase of the respiratory chain. *EMBO J*. 1992;11(9):3219-27.
10. Marcus RA, Sutin N. Electron transfers in chemistry and biology. *Biochim Biophys Acta*. 1985;811(3):265-322.
11. Moser CC, Farid TA, Chobot SE, Dutton PL. Electron tunneling chains of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1757(9-10):1096-109.
12. Mitchell P. The protonmotive Q cycle: a general formulation. *FEBS Lett*. 1975;59(2):137-9.
13. Crofts AR, Meinhardt SW, Jones KR, Snozzi M. The role of the quinone pool in the cyclic electron-transfer chain of Rhodospseudomonas sphaeroides: A modified Q-cycle mechanism. *Biochim Biophys Acta*. 1983;723(2):202-218.
14. Osyczka A, Moser CC, Daldal F, Dutton PL. Reversible redox energy coupling in electron transfer chains. *Nature*. 2004;427(6975):607-12.
15. Muller F, Crofts AR, Kramer DM. Multiple Q-cycle bypass reactions at the Q_o site of the cytochrome bc1 complex. *Biochemistry*. 2002;41(25):7866-74.

16. Zhu J, Egawa T, Yeh SR, Yu L, Yu CA. Simultaneous reduction of iron-sulfur protein and cytochrome b(L) during ubiquinol oxidation in cytochrome bc(1) complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(12):4864-9.
17. Sarewicz M, Dutka M, Pintscher S, Osyczka A. Triplet state of the semiquinone-Rieske cluster as an intermediate of electronic bifurcation catalyzed by cytochrome bc1. *Biochemistry*. 2013;52(37):6388-95.
18. Xia D, Yu CA, Kim H, et al. Crystal structure of the cytochrome bc1 complex from bovine heart mitochondria. *Science*. 1997;277(5322):60-6.
19. Czapla M, Cieluch E, Borek A, Sarewicz M, Osyczka A. Catalytically-relevant electron transfer between two hemes bL in the hybrid cytochrome bc1-like complex containing a fusion of *Rhodobacter sphaeroides* and *capsulatus* cytochromes b. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1827(6):751-60.
20. Pintscher S, Pietras R, Sarewicz M, Osyczka A. Electron sweep across four b-hemes of cytochrome bc revealed by unusual paramagnetic properties of the Q semiquinone intermediate. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. 2018;1859(6):459-469.
21. Link TA. The role of the 'Rieske' iron sulfur protein in the hydroquinone oxidation (Q(P)) site of the cytochrome bc1 complex. The 'proton-gated affinity change' mechanism. *FEBS Lett*. 1997;412(2):257-64.
22. Sarewicz M, Bujnowicz Ł, Bhaduri S, Singh SK, Cramer WA, Osyczka A. Metastable radical state, nonreactive with oxygen, is inherent to catalysis by respiratory and photosynthetic cytochromes bc1/b6f. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114(6):1323-1328.
23. Sarewicz M, Ekiert R, Osyczka A. Inter-Monomer Electron Transfer in Cytochrome bc Complexes. In: Cramer W, Kallas T, ed. *Cytochrome complexes: Evolution, Structures, Energy Transduction, and Signaling*. 2016:281-294.